

普罗布考对 $ApoE^{-/-}$ 小鼠动脉粥样硬化的影响及其机制

李栋^{1,2} 安毅¹

(1 青岛大学附属医院心内科, 山东 青岛 266003; 2 临沂市人民医院急诊内科)

[摘要] 目的 探讨普罗布考抑制巨噬细胞 M1 极化对 $ApoE^{-/-}$ 小鼠动脉粥样硬化进展的影响及其机制。方法 20 只 $ApoE^{-/-}$ 小鼠随机分为对照组和普罗布考组。两组均给予高脂饲料喂养, 普罗布考组隔日 1 次以普罗布考灌胃, 对照组以等剂量生理盐水灌胃, 干预 12 周后分别麻醉后心尖取血, 然后颈椎脱臼法处死小鼠留取主动脉血管, 利用生化仪检测小鼠血脂、肝肾功能情况; ELISA 法检测小鼠血清中炎症因子(IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α)水平; 对主动脉进行整体油红 O 染色, 检测动脉粥样硬化斑块面积; 取主动脉根部行冰冻切片, 通过油红 O 染色检测斑块面积和脂质沉积情况, 采用 Masson 染色检测斑块稳定性, 以组织免疫荧光法检测斑块巨噬细胞、平滑肌细胞、胶原纤维及巨噬细胞 M1 极化情况, 采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)方法检测两组小鼠主动脉斑块中炎症因子 mRNA 的水平。提取 C57BL/6J 小鼠腹腔原代巨噬细胞, 分为两组, 对照组给予脂多糖(LPS)联合干扰素- γ (IFN- γ)处理, 普罗布考组在对照组基础上给予普罗布考处理, 通过 ELISA 和 RT-qPCR 方法检测炎症因子(IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α)、巨噬细胞 M1 极化标志物(*iNOS*、*CD86*)mRNA 的水平。结果 与对照组相比, 普罗布考组 $ApoE^{-/-}$ 小鼠血清中三酰甘油、总胆固醇及低密度脂蛋白水平改善($t=2.445\sim 4.024, P<0.05$), 主动脉血管斑块面积减小($t=3.599, 2.954, P<0.05$); 同时, 普罗布考组主动脉根部斑块中脂质沉积减少, 平滑肌和胶原纤维含量增多, 巨噬细胞及其 M1 极化标志物明显减少。普罗布考组和对照组相比, 小鼠血清以及主动脉根部斑块中炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平降低($t=2.388\sim 4.891, P<0.05$)。同时与对照组相比, 普罗布考组小鼠腹腔原代巨噬细胞中炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平降低($t=4.238\sim 9.580, P<0.05$), *CD86*、*iNOS* mRNA 水平明显降低($t=3.251, 20.860, P<0.05$)。结论 普罗布考可延缓小鼠主动脉粥样硬化进展并促进斑块稳定, 其机制可能与抑制主动脉巨噬细胞 M1 极化、减轻斑块炎症反应有关。

[关键词] 动脉粥样硬化; 普罗布考; 巨噬细胞; 炎症; 疾病模型, 动物

[中图分类号] R543.5 **[文献标志码]** A

EFFECT OF PROBUCOL ON ATHEROSCLEROSIS IN $ApoE^{-/-}$ MICE AND ITS MECHANISM LI Dong, AN Yi (Department of Cardiology, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effect of probucol on the progression of atherosclerosis in $ApoE^{-/-}$ mice by inhibiting macrophage M1 polarization and its mechanism. **Methods** A total of 20 $ApoE^{-/-}$ mice were randomly divided into control group and probucol group. Both groups were given high-fat diet, and the mice in the probucol group were given probucol by gavage once every other day, while those in the control group were given an equal volume of normal saline by gavage. After 12 weeks of intervention, blood samples were collected from the apex of the heart after anesthesia, and the mice were sacrificed by cervical dislocation to collect the aorta vessels. A biochemical analyzer was used to measure blood lipids and liver and renal functions, and ELISA was used to measure the serum levels of inflammatory factors (IL-1 β , IL-6, and TNF- α). Oil red O staining was performed for the aorta to measure the plaque area of atherosclerosis; the aortic root was collected to prepare frozen sections, and then oil red O staining was used to measure plaque area and lipid deposition; Masson staining was used to measure plaque stability. Immunofluorescence assay was used to observe macrophages, smooth muscle cells, collagen fibers, and macrophage M1 polarization in plaques, and quantitative real-time PCR was used to measure the mRNA expression levels of inflammatory factors in aortic plaques. Primary peritoneal macrophages were collected from C57BL/6J mice and divided into control group and probucol group. The macrophages in the control group were treated with lipopolysaccharide (LPS) combined with interferon- γ (IFN- γ), and those in the probucol group were treated with probucol in addition to the treatment in the control group. ELISA and RT-qPCR were used to measure the mRNA expression levels of inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, and TNF- α) and macrophage M1 polarization markers (*iNOS* and *CD86*). **Results** Compared with the control group, the probucol group had significant improvements in the serum levels of triglyceride, total cholesterol, and low-density lipoprotein cholesterol ($t=2.445-4.024, P<0.05$) and a significant reduction in aortic plaque area ($t=3.599, 2.954, P<0.05$), as well as a significant reduction in lipid deposition, significant increases

in smooth muscle and collagen fiber, and significant reductions in macrophages and their M1 polarization markers in aortic root plaques. Compared with the control group, the probucol group had

[收稿日期] 2023-03-11; **[修订日期]** 2023-05-09

[基金项目] 青岛西海岸新区 2019 年度科技项目(2019-58)

[通讯作者] 安毅, Email: 1423120555@qq.com

significant reductions in the levels of the inflammatory factors IL-1 β , IL-6, and TNF- α in serum and aortic root plaques ($t = 2.388 - 4.891, P < 0.05$). Compared with the control group, the probucol group of primary peritoneal macrophages had significant reductions in the levels of the inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, and TNF- α ($t = 4.238 - 9.580, P < 0.05$) and the mRNA expression levels of *iNOS* and *CD86* ($t = 3.251, 20.860, P < 0.05$). **Conclusion** Probucol can delay the progression of atherosclerosis and promote plaque stability in *ApoE*^{-/-} mice, possibly by inhibiting macrophage M1 polarization and alleviating plaque inflammatory response.

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Probucol; Macrophages; Inflammation; Disease models, animal

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是由多种因素参与的动脉血管的慢性炎症性疾病^[1]。巨噬细胞在 AS 发生、发展和转归中发挥重要作用。斑块中的巨噬细胞可根据局部微环境的变化呈现不同的表型,其中 M1 型巨噬细胞分泌促炎因子,加速斑块进展,并使斑块不稳定性增高;M2 型巨噬细胞分泌抗炎因子,可抑制 AS 进展^[2]。因此,如何抑制巨噬细胞 M1 极化或促进巨噬细胞 M2 极化,对于减轻斑块炎症反应、促进斑块稳定意义重大。

普罗布考具有抗氧化和调血脂的作用,临床上主要用于高脂血症和 AS 治疗^[3]。另外普罗布考还具有减轻同型半胱氨酸引起氧化应激和炎症反应、抑制血管弹性纤维降解、抑制白细胞黏附、抑制树突状细胞活化以及改善内皮功能等作用^[4-8]。但普罗布考能否调控动脉中巨噬细胞极化尚无研究报道。本研究通过构建 AS 小鼠模型和体外细胞实验,旨在揭示普罗布考对 AS 进展的影响,并从巨噬细胞极化角度探讨普罗布考影响 AS 进展的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

清洁级健康雄性 *ApoE*^{-/-} 小鼠 20 只,8 周龄,品系背景为 *C57BL/6J*,健康雄性 *C57BL/6J* 小鼠 10 只,8 周龄,均购自北京维通利华实验动物技术有限公司,均于恒温恒湿及昼夜交替环境中饲养。普罗布考购自美国 Sigma 公司,ELISA 试剂盒购自美国 RD 公司,一抗 α -SMA、CD86 购自美国 CST 公司,MOMA-2 购自美国 Bio-Rad 公司,*iNOS*、IL-1 β 购自美国 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与处理 20 只 *ApoE*^{-/-} 小鼠随机分为对照组和普罗布考组,每组 10 只。两组小鼠均以高脂饲料喂养 12 周后,普罗布考组小鼠隔日 1 次灌胃普罗布考(30 mg/kg),对照组隔日 1 次灌胃等剂量的生理盐水,均灌胃 12 周。

1.2.2 两组小鼠各项指标检测 灌胃 12 周后,腹腔注射 10 g/L 戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉两组小

鼠,心尖取血,离心以后采用全自动生化检测仪检测血清中三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白(LDL-C)、肌酐(CRE)、尿素(UREA)、尿酸(UA)含量及丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)的水平,采用 ELISA 法检测血清中炎症因子白细胞介素 1 β (IL-1 β)、IL-6、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的水平,检测步骤严格按照试剂盒说明书进行。颈椎脱臼法处死小鼠后开胸取主动脉血管(包括主动脉弓及分支部分),置于 40 g/L 多聚甲醛溶液中固定。随机取每组 5 只小鼠的主动脉血管,进行油红 O 染色,检测斑块面积,计算斑块面积占血管壁总面积百分比。取每组另外 5 只小鼠的动脉血管,OCT 包埋,制备 5~6 μ m 厚冷冻切片,使用油红 O 染色检测主动脉根部切片中斑块面积大小,以 Masson 染色法检测斑块稳定性,采用组织免疫荧光方法检测两组小鼠动脉斑块中的巨噬细胞、平滑肌细胞、胶原纤维以及巨噬细胞 M1 极化情况,采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)方法检测两组小鼠主动脉斑块中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α mRNA 的水平,检测步骤严格按照试剂盒说明书要求进行。

1.2.3 小鼠腹腔原代巨噬细胞提取和分组 8 周龄雄性 *C57BL/6J* 小鼠 10 只,颈椎脱臼法处死后,立即浸于含体积分数 0.75 乙醇中 2 min。然后在小鼠腹部剪一小口,充分暴露腹膜,使用无菌注射器向腹腔注入约 10 mL 预冷的无菌 PBS,使腹腔内充满 PBS;反复抽打腹腔 PBS 后,以无菌注射器将腹腔悬液移至另一无菌管中,以 800 r/min 离心 5 min;弃掉 PBS,并使用含有体积分数 0.10 胎牛血清的 DMEM 培养基重悬细胞;置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中进行培养,待细胞贴壁生长融合度约 75%时,PBS 清洗 1 次,更换新鲜含体积分数 0.10 胎牛血清的 DMEM 培养基后继续培养,获得小鼠腹腔原代巨噬细胞。

将小鼠腹腔原代巨噬细胞分为两组,每组设置 3 个复孔,结果取平均值,其中对照组的巨噬细胞以 LPS(100 μ g/L)+INF- γ (20 μ g/L)处理 24 h;普罗布考组的巨噬细胞以普罗布考(10 μ mol/L)+LPS(100 μ g/L)+INF- γ (20 μ g/L)处理 24 h。然后采

用 ELISA 方法检测两组巨噬细胞中的炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平,检测严格按照试剂盒说明书进行。

1.2.4 RT-qPCR 方法检测各组细胞中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、CD86 和 iNOS mRNA 的相对表达水平分别取对照组、普罗布考组小鼠主动脉根部血管和巨噬细胞,后分别加入 1 mL TRIzol 试剂,根据试剂盒说明书要求提取总 RNA,根据反转录试剂盒说明书的要求进行逆转录,条件为 42 $^{\circ}$ C 30 min,95 $^{\circ}$ C 2 min。根据 SYBR GREEN 染料试剂盒说明书要求,以 cDNA 模板为底物进行扩增,反应体系的总体积为 15 μ L,其中引物 1 μ L,cDNA 模板 1 μ L,SYBR GREEN 染料 5.5 μ L 和去离子水 7.5 μ L。以 β -actin 为内参照,根据 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因的相对表达水平。引物由上海博尚生物技术有限公司提供,引物名称及其序列见表 1。

表 1 引物名称及其序列

名称	序列	长度(bp)
IL-1 β	F:5'-GTGTCTTTCCCGTGGACCTT-3'	20
	R:5'-AATGGGAACGTCACACACCA-3'	20
IL-6	F:5'-CTGGTCTTCTGGAGTACCATAGC-3'	23
	R:5'-TCTGTGACTCCAGCTTATCTCTTGG-3'	25
TNF- α	F:5'-GTCCGGCAGGTCTACTTTG-3'	20
	R:5'-GGGGCTCTGAGGAGTAGACA-3'	20
CD86	F:5'-GCAGCACGGAAGTGAACAAC-3'	20
	R:5'-CCTTTGTAAATGGGCACGGC-3'	20
iNOS	F:5'-GGGTCAACAACCTTACAGGGAGT-3'	22
	R:5'-GAGTGAACAAGACCAAGCG-3'	20
β -actin	F:5'-GGCTGTATTCCCCTCCATCG-3'	20
	R:5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3'	22

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计分析。使用 Shapiro-Wilk 检验数据是否符合正态分布,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较采用独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 普罗布考对 ApoE $^{-/-}$ 小鼠血脂和肝肾功能的影响

与对照组小鼠相比较,普罗布考组小鼠血清中的 TG、TC 及 LDL-C 水平均明显下降($t = 2.445 \sim 4.024, P < 0.05$),其他指标比较差异均无显著意义($P > 0.05$)。见表 2。

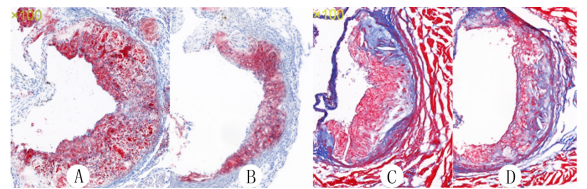
2.2 普罗布考对 ApoE $^{-/-}$ 小鼠 AS 斑块面积和稳定性的影响

主动脉血管油红 O 染色显示,对照组和普罗布

考组小鼠的斑块面积与血管壁总面积比值分别为 $(27.40 \pm 0.02)\%$ 和 $(17.40 \pm 0.02)\%$,两组比较差异有显著性($t = 3.599, P < 0.05$)。主动脉根部切片油红 O 染色显示,对照组和普罗布考组小鼠斑块面积分别为 (35.40 ± 4.18) 、 $(21.80 \pm 1.93) \text{ mm}^2$,两组比较差异具有显著性($t = 2.954, P < 0.05$);与对照组相比,普罗布考组小鼠主动脉根部斑块中脂质明显减少(图 1A、B)。Masson 染色结果显示,与对照组进行比较,普罗布考组小鼠的主动脉根部斑块中胶原纤维明显增多(图 1C、D)。免疫荧光染色显示,与对照组相比,普罗布考组小鼠的主动脉根部斑块中巨噬细胞(MAMO-2)明显减少,斑块纤维帽处平滑肌细胞(α -SMA)和胶原纤维均明显增多(图 2),图中红色为巨噬细胞,绿色为平滑肌细胞以及胶原纤维。

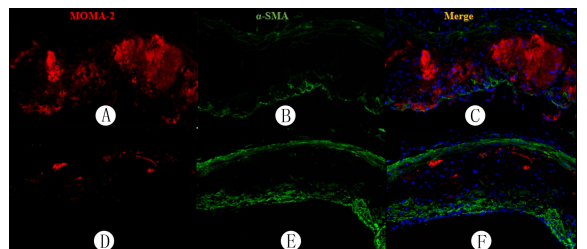
表 2 两组小鼠血清血脂和肝肾功能指标比较($n = 10, \bar{x} \pm s$)

指标	对照组	普罗布考组	t 值	P 值
TG($\text{c}/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	1.10 \pm 0.11	0.84 \pm 0.23	2.445	0.040
TC($\text{c}/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	17.95 \pm 2.00	13.63 \pm 1.44	4.024	0.002
LDL-C($\text{c}/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	7.89 \pm 1.03	4.12 \pm 1.14	3.665	0.003
ALT($\mu\text{g}/\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	19.76 \pm 3.43	21.04 \pm 2.46	0.497	0.593
AST($\mu\text{g}/\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	56.41 \pm 4.21	52.69 \pm 4.42	0.609	0.556
CRE($\text{c}/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	15.87 \pm 3.02	11.54 \pm 1.78	1.278	0.227
UREA($\text{c}/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	5.50 \pm 0.66	5.53 \pm 0.36	0.036	0.971
UA($\text{c}/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	737.40 \pm 71.25	613.70 \pm 62.76	1.302	0.222



A、B:主动脉根部切片油红 O 染色(红色表示脂质含量),C、D:主动脉根部切片 Masson 染色(蓝色表示胶原纤维含量),100 倍

图 1 两组小鼠主动脉根部切片染色结果



A、B:对照组,C:对照组融合图,D、E:普罗布考组,F:普罗布考组融合图;组织免疫荧光法,200 倍

图 2 各组小鼠主动脉根部切片免疫荧光染色结果

2.3 普罗布考对 ApoE $^{-/-}$ 小鼠血清和动脉斑块中炎症因子的影响

与对照组相比,普罗布考组小鼠血清中炎症因

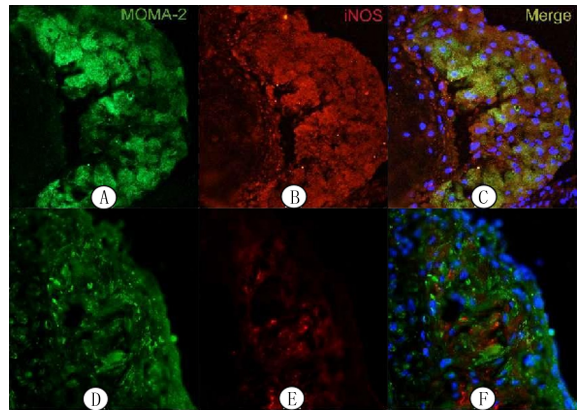
子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平明显降低($t=2.388\sim 4.891, P<0.05$); 主动脉斑块中 IL-1 β 、IL-6 以及 TNF- α mRNA 的表达水平亦明显降低, 差异具有显著性($t=3.060\sim 4.507, P<0.05$)。见表 3。

2.4 普罗布考对小鼠巨噬细胞 M1 极化的影响

与对照组相比较, 普罗布考组中 MOMA-2⁺ 和 iNOS⁺ 细胞数量及其比例明显减少, 见图 3。图中绿色为 MOMA-2, 红色为巨噬细胞 M1 极化标志物 iNOS。

ELISA 检测结果显示, 与对照组比较, 普罗布考组细胞中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量明显减低($t=4.238\sim 9.580, P<0.05$); RT-qPCR 检测结果也显示, 巨噬细胞的 M1 极化标志物 CD86、iNOS 和炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α mRNA 的水平亦均明

显降低($t=3.251\sim 36.190, P<0.05$)。见表 4。



A、B: 对照组, C: 对照组融合图; D、E: 普罗布考组, F: 普罗布考组融合图; 组织免疫荧光法, 400 倍

图 3 两组小鼠动脉斑块中巨噬细胞及其 M1 极化标志物的比较

表 3 两组小鼠动脉斑块和血清炎症因子水平变化比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	ELISA 检测结果($\rho/\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)			RT-qPCR 检测结果		
	IL-1 β	IL-6	TNF- α	IL-1 β	IL-6	TNF- α
对照组	15.98 \pm 2.65	2.92 \pm 0.45	2.26 \pm 0.54	1.02 \pm 0.21	1.09 \pm 0.13	1.01 \pm 0.14
普罗布考组	8.50 \pm 1.52	2.13 \pm 0.36	1.65 \pm 0.19	0.59 \pm 0.23	0.75 \pm 0.14	0.62 \pm 0.14

表 4 小鼠腹腔原代巨噬细胞 M1 极化标志物及上清炎症因子水平变化比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	RT-qPCR 检测结果					ELISA 检测结果($\rho/\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)		
	CD86	iNOS	IL-1 β	IL-6	TNF- α	IL-1 β	IL-6	TNF- α
对照组	16.67 \pm 0.94	3 623.09 \pm 129.10	3 753.35 \pm 183.59	4 406.52 \pm 495.20	207.50 \pm 23.22	26.43 \pm 3.61	116.21 \pm 5.30	214.49 \pm 10.54
普罗布考组	13.39 \pm 1.75	892.40 \pm 21.91	369.81 \pm 35.27	242.59 \pm 13.18	144.52 \pm 8.92	16.37 \pm 3.11	82.61 \pm 5.35	143.95 \pm 10.14

3 讨 论

AS 是一种涉及多种细胞和多种生物学过程的复杂病变。当各种因素诱导血管发生 AS 时, 血管内皮细胞受损, 白细胞黏附到受损处, 进而通过内皮间隙浸润至血管内膜。内膜中的单核细胞进一步分化为巨噬细胞, 可吞噬修饰的低密度脂蛋白及凋亡细胞等, 变成泡沫细胞^[9]。泡沫细胞是 AS 的特征性细胞^[10]。泡沫细胞后期发生凋亡坏死, 释放脂质和各种抗原, 构成了斑块的坏死核心, 加剧斑块的炎症反应。巨噬细胞或泡沫细胞可分泌大量的炎症因子、趋化因子和基质金属酶, 一方面会招募更多的白细胞浸润, 另一方面会导致内皮细胞和平滑肌细胞发生形态和功能学改变, 如内皮细胞凋亡、平滑肌细胞表型转换, 此外基质金属酶会直接降解胶原纤维, 导致斑块纤维帽变薄, 易于破裂。

巨噬细胞极化与 AS 发生关系密切。斑块中的多种成分比如胆固醇结晶、氧化 LDL-C、TNF- α 以及微修饰 LDL-C 均可诱导巨噬细胞 M1 极化^[9-11]。M1 型巨噬细胞与斑块发生、发展及不稳定有关。

M1 型巨噬细胞分泌的 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 一方面增加 LDL 跨内皮进入内膜中, 促进了 AS 的进展^[11]; 另一方面导致内皮细胞活化, 内皮细胞凋亡增加, 内皮一氧化氮合酶表达降低, 引起内皮功能紊乱, 加速 AS 的进展^[11]。其次, M1 型巨噬细胞可引起平滑肌细胞凋亡, 使动脉中膜变薄, 血管重构。最后, M1 型巨噬细胞大量分泌基质金属蛋白酶, 降解胶原纤维, 使纤维帽变薄, 易于发生斑块破裂^[12]。

普罗布考具有多重药理学效应, 包括调脂、抗炎、抗氧化及改善血管内皮功能等, 在临床上多用于 AS 性心血管疾病的防治^[13-16]。近年来研究还发现了普罗布考的多种生物学作用, 如普罗布考可逆转同型半胱氨酸诱导的单核细胞分化和氧化应激^[4], 抑制链脲霉素诱导的糖尿病小鼠 CD11c⁺ 树突状细胞的免疫成熟^[7], 抑制脂多糖诱导的白细胞黏附^[6], 抑制血管弹性纤维降解等^[5]。但是, 普罗布考能否调控巨噬细胞极化尚不清楚。

本研究探讨了普罗布考对高脂饮食诱导的小鼠 AS 的影响及对斑块中巨噬细胞极化的影响。通过以上实验结果显示该浓度的普罗布考干预未对小鼠

的肝肾功造成损害,经普罗布考治疗能降低小鼠血脂水平,减小 AS 斑块面积,使得斑块更加稳定,降低全身和斑块中炎症因子水平;更重要的是,普罗布考抑制了斑块中巨噬细胞 M1 极化,表现为多种 M1 极化标志物例如 CD86、iNOS、IL-1 β 的 mRNA 水平均明显降低。本研究在体外实验中,进一步验证了普罗布考对巨噬细胞 M1 极化的调控作用。由此,我们揭示了普罗布考通过调控巨噬细胞极化和炎症反应从而抑制 AS 的新机制。

本课题尚有一些局限性。首先,本研究虽然发现了普罗布考可抑制巨噬细胞 M1 极化,但没有阐明普罗布考调控 M1 极化的分子机制。其次,普罗布考能否调控巨噬细胞 M2 极化尚不清楚。再者,普罗布考调控的巨噬细胞 M1 极化在多大程度上影响 AS 仍需研究。最后,在临床上服用普罗布考能否减轻 AS 患者斑块中巨噬细胞 M1 极化亦需要进一步研究。

综上所述,本研究探讨了普罗布考对 ApoE^{-/-} 小鼠 AS 的影响,结果显示普罗布考可延缓小鼠 AS 进展并促进斑块稳定,其机制可能与抑制巨噬细胞 M1 极化、减轻斑块炎症反应有关。

伦理批准和动物权利声明:本研究涉及的所有实验均已通过青岛大学附属医院实验动物福利伦理委员会的审核批准(文件号 AHQU-MAL20190510)。所有实验过程均遵照《实验动物福利伦理原则》的条例进行。

作者声明:李栋、安毅参与了研究设计和论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文,且均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

[1] LIBBY P. Inflammation in atherosclerosis=No longer a theory [J]. Clin Chem, 2021,67(1):131-142.

[2] JINNOUCHI H, GUO L, SAKAMOTO A, et al. Diversity of macrophage phenotypes and responses in atherosclerosis[J]. Cell Mol Life Sci, 2020,77(10):1919-1932.

[3] KANG H J, KIM M H, SUNG J, et al. Effect of probucol and/or cilostazol on carotid intima media thickness in patients with coronary heart disease: A randomized, multicenter, multinational study[J]. J Atheroscler Thromb, 2021,28(2):124-136.

[4] ZHANG M L, HOU Y C, SHEN Y L, et al. Probucol reverses homocysteine induced inflammatory monocytes differentiation and oxidative stress[J]. Eur J Pharmacol, 2018,818:67-73.

[5] CHEN C, WANG Y X, CAO Y N, et al. Mechanisms underlying the inhibitory effects of probucol on elastase-induced abdominal aortic aneurysm in mice[J]. Br J Pharmacol, 2020, 177(1):204-216.

[6] ZUCOLOTO A Z, MANCHOPE M F, STAURENGO-FERRARI L, et al. Probucol attenuates lipopolysaccharide-induced leukocyte recruitment and inflammatory hyperalgesia: Effect on NF- κ B activation and cytokine production[J]. Eur J Pharmacol, 2017,809:52-63.

[7] ZHU H, JIN X T, ZHAO J J, et al. Probucol protects against atherosclerosis through lipid-lowering and suppressing immune maturation of CD11c+ dendritic cells in STZ-induced diabetic LDLR^{-/-} mice[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2015,65(6):620-627.

[8] CHEN Y, HU K, BU H R, et al. Probucol protects circulating endothelial progenitor cells from ambient PM_{2.5} damage via inhibition of reactive oxygen species and inflammatory cytokine production *in vivo* [J]. Exp Ther Med, 2018,16(6): 4322-4328.

[9] LEVIN M G, ZUBER V, WALKER V M, et al. Prioritizing the role of major lipoproteins and subfractions as risk factors for peripheral artery disease[J]. Circulation, 2021,144(5): 353-364.

[10] YUAN Y, LI P, YE J. Lipid homeostasis and the formation of macrophage-derived foam cells in atherosclerosis[J]. Protein Cell, 2012,3(3):173-181.

[11] ZHANG Y Z, YANG X Y, BIAN F, et al. TNF- α promotes early atherosclerosis by increasing transcytosis of LDL across endothelial cells: Crosstalk between NF- κ B and PPAR- γ [J]. J Mol Cell Cardiol, 2014,72:85-94.

[12] HUANG W C, SALA-NEWBY G B, SUSANA A, et al. Classical macrophage activation up-regulates several matrix metalloproteinases through mitogen activated protein kinases and nuclear factor- κ B[J]. PLoS One, 2012,7(8):e42507.

[13] DERANGULA K, JAVALGEKAR M, KUMAR ARRURI V, et al. Probucol attenuates NF- κ B/NLRP3 signalling and augments Nrf-2 mediated antioxidant defence in nerve injury induced neuropathic pain [J]. Int Immunopharmacol, 2022, 102:108397.

[14] 王敏,谭若月,赵水平. 普罗布考对高脂血症患者血脂及氧化型低密度脂蛋白和单核细胞趋化蛋白-1 的影响[J]. 中国循环杂志, 2014,29(1):31-34.

[15] 赵雯娜,李娜,董晓楠,等. 瑞舒伐他汀与普罗布考抗大鼠动脉粥样硬化机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2013,30(6):601-606.

[16] 刘茂柏,李娜,郑斌,等. 普罗布考抗动脉粥样硬化作用的 meta 分析[J]. 中国现代应用药学, 2017,34(4):579-586.

(本文编辑 耿波 厉建强)